

# اثر هیپرتیروئیدیسم تجربی بر فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز در مغز Rat در طول رشد

مرتضی نیکوکار\*

## چکیده:

تحقیقات انجام شده بر روی تأثیر هورمونهای تیروئیدی در متابولیسم انرژی بیانگر افزایش مصرف اکسیژن در اکثر بافت‌های بدن می‌باشد، اما این امر در مغز مشاهده نمی‌شود. از آنجا که گلوکز منبع اصلی تولید انرژی در مغز است، در این تحقیق اثر هورمونهای تیروئیدی بر روی فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز همراه با اندازه‌گیری غلظت گلوکز و گلیکوژن در مغز Rat مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز و لاکتات دهیدروژناز و عدم تغییر در فعالیت آنزیم آکونیتاز و میزان گلوکز و گلیکوژن می‌باشد. تأثیر بر افزایش فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز و لاکتات دهیدروژناز می‌تواند در راستای اثر این هورمون‌ها بر روی افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در سایر سلولهای بدن قرار گیرد، اما عدم تأثیر بر روی فعالیت آنزیم آکونیتاز بیانگر عدم تأثیر هورمون‌ها بر روی میتوکندری سلولهای بافت مغز بر خلاف سایر سلولهای بدن است. در توجیه این امر وجود رستپور بر روی غشاء میتوکندری بافت‌های حساس به هورمون تیروئید و تعداد بسیار کم این گیرنده‌ها در سطح میتوکندری سلولهای مغز می‌تواند مؤثر باشد. اما هنوز به درستی مشخص نیست که اتصال هورمون به این رستپورها به چه منظور صورت می‌پذیرد.

واژه‌های کلیدی: هیپرتیروئیدیسم، هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز، آکونیتاز، لیوتیرونین سدیم

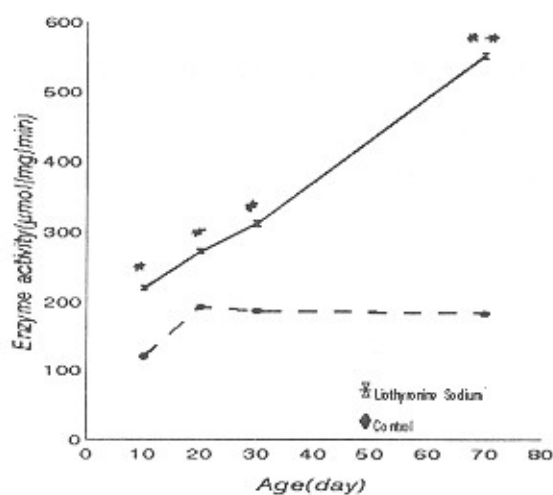
## مقدمه:

از آن‌جا که گلوکز منبع اصلی سوخت و تولید انرژی در مغز می‌باشد (۴)، مطالعه بر روی متابولیسم انرژی این ماده در مغز در حالت طبیعی و در مقایسه با حالت هیپرتیروئیدیسم می‌تواند اهمیت نقش این هورمون‌ها را بر روی متابولیسم انرژی این ماده در مغز بیشتر نمایان سازد.

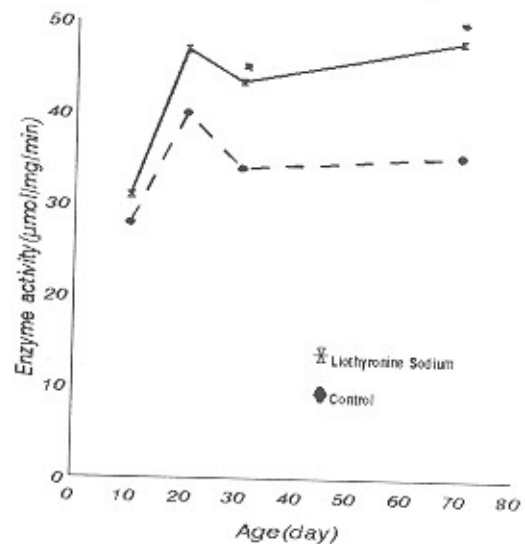
در این بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز، لاکتات دهیدروژناز و آکونیتاز همراه با میزان تغییرات گلوکز و گلیکوژن در هموزن بافت مغز Rat در طول رشد در حالات طبیعی و هیپرتیروئیدیسم تجربی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی فعالیت آنزیم هگزوکیناز در جهت بررسی میزان برداشت گلوکز توسط بافت مغز و فعالیت مسیر گلیکولیز صورت پذیرفت. همچنین اسید

مطالعه بر روی تغییرات بیوشیمیایی بافت مغز، بیانگر تغییراتی قابل توجه در میزان متابولیسم انرژی این بافت در طول سه هفته ابتدایی زندگی می‌باشد (۱). این امر در راستای افزایش انرژی مغز در طی این دوره صورت می‌پذیرد. یقیناً عوامل متعددی را می‌توان در روند این تغییرات سهم دانست.

یکی از مهم‌ترین این عوامل هورمون‌ها هستند که بویژه اثر هورمونهای غده تیروئید در تنظیم متابولیسم انرژی بدن در طول رشد از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (۲). اثر عمومی هورمونهای تیروئیدی، افزایش مصرف اکسیژن می‌باشد. این مهم بااستثنا برخی از بافت‌های بدن مانند مغز، طحال و بیضه در کلیه ارگانهای بدن مشاهده می‌شود (۳).



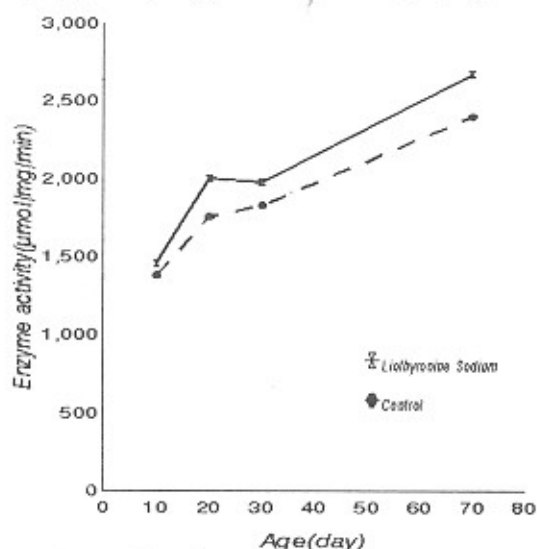
**نمودار شماره ۲:** نمایش تغییرات فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی  
 $P < 0.05$  \*  $P < 0.01$  \*\*



**نمودار شماره ۱:** نمایش تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی  
 $P < 0.05$  \*

### نتایج:

تغییرات فعالیت آنزیم طی دوران رشد در هیپرتیروئیدیسم تجربی شبیه به حالت نرمال می‌باشد. در نمودار شماره ۲ تغییرات فعالیت آنزیم LDH در حالت پرکاری تجربی غده تیروئید در مقایسه با حالت کنترل، طی دوران رشد نشان داده شده است. در این نمودار دیده می‌شود که آنزیم LDH بیشترین افزایش فعالیت خود را در حالت نرمال تقریباً در ۲۰ روز اول



**نمودار شماره ۳:** نمایش تغییرات فعالیت آنزیم آکونیتاز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی

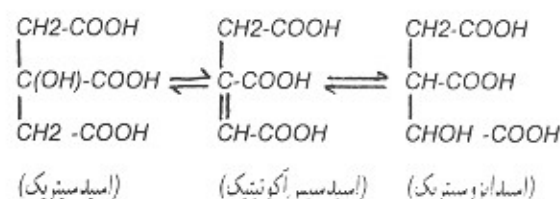
نتایج نشان داد که در حالت هیپرتیروئیدیسم تجربی فعالیت آنزیم هگزوکیناز مغز در مقایسه با کنترل در تمام طول رشد دارای افزایش می‌باشد، همچنین تزریق لیوتیرونین سدیم باعث افزایش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز بافت مغز نیز گردید، ولی تأثیری بر روی فعالیت آنزیم آکونیتاز نداشت. میزان گلوکز و گلیکوکژن بافت مغز نشان دهنده عدم تغییرات معنی دار در حالت هیپرتیروئیدیسم تجربی در مقایسه با حالت کنترل بود.

در نمودار شماره ۱ میزان تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز در طول رشد در حالت هیپرتیروئیدیسم در مقایسه با کنترل نشان داده شده است. در حالت هیپرتیروئیدیسم تجربی، افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با کنترل در تمام طول رشد مشاهده می‌گردد.

باتوجه به این نمودار مشاهده می‌شود که با افزایش سن، میزان فعالیت آنزیم در حالت پرکاری غده تیروئید نسبت به کنترل افزایش بیشتری می‌یابد و میزان این افزایش در روزهای ۳۰ و ۷۰ بعد از تولد قابل ملاحظه است ( $P < 0.05$ ). البته بایستی در نظر داشت که، الگوی

متد اندازه گیری فعالیت آنزیم آکونیتاز (۴.۲.۱.۳):

سیترات به کمک آنزیم آکونیتاز (آکونیتات هیدراتاز) که دارای یون آهن دو ظرفیتی است، طی دو مرحله به ایزوسیترات تبدیل می گردد.



م فعالیت آنزیم آکونیتاز با تغییرات مقدار اسید سیس آکونیتیک متناسب است. این اسید در طول موج ۲۴۰ نانومتر ماکزیم جذب نور را دارد. از این رو تغییرات میزان تولید این ترکیب در این طول موج اندازه گیری می شود.

افزایش جذب نور در طول موج ۲۴۰ نانومتر به میزان ۰/۰۰۱ در دقیقه، برابر تولید یک میکرومول اسید سیس آکونیتیک یا یک واحد فعالیت آنزیم است (۷).

$$\begin{aligned}
 \text{فعالیت} &= \frac{\Delta A/\text{min}}{0.001} \times \text{ضریب رقت} \quad (\mu \text{ mol}/\text{min}/\text{L}) \\
 \text{فعالیت} &= \frac{(\text{V/L})}{\text{پروتئین}} \quad (\mu \text{ mol}/\text{mg}/\text{min}) \\
 &= \frac{\text{فعالیت}}{\text{mgr/ml}}
 \end{aligned}$$

روش اندازه گیری میزان گلوکز:

جهت اندازه گیری میزان گلوکز از روش ارتوتولوئیدین استفاده شد که در آن آمین حلقوی ارتوتولوئیدین با گلوکز واکنش داده و در محلول اسید استیک گرم تولید مشتق رنگی می نماید (۸).

بازنشیف  $\xrightarrow{H_2O}$  گلیکوزیل آمین  $\longrightarrow$  ارتوتولوئیدین + گلوکز  
میزان جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری گشته و در مقایسه با استاندارد میزان گلوکز تعیین می گردد.

تعیین مقدار گلیکوژن:

گلیکوژن در مجاورت اسید سولفوریک گرم و غلیظ هیدرولیز شده و گلوکز حاصله با اسید سولفوریک واکنش داده و تولید ۵- هیدروکسی متیل فورفورال می نماید، که ایجاد رنگ ارغوانی خواهد نمود (۹).

غلظت گلیکوژن موجود در نمونه با استفاده از اسپکتروفتومتر (طول موج ۵۲۰ نانومتر) و با روش زیر محاسبه می شود.

$$\text{گلیکوژن نام} = \text{غلظت استاندارد گلوکز} \times \frac{\text{ابزورانس آزمایش}}{\text{ابزورانس استاندارد گلوکز}}$$

$$\text{گلیکوژن مغز} = ۰/۹ \times (\text{میزان گلوکز آزاد مغز} - \text{میزان گلوکز نام مغز})$$

روش اندازه گیری پروتئین:

متد لوری با استفاده از معرف فولین سیوکالتو جهت اندازه گیری پروتئین های بافت مغز مورد استفاده قرار گرفت. در این روش ابتدایک واکنش میان پروتئین و مس اتفاق می افتد (واکنش بیوره)، و سپس اسید فسفومولیبد و تنگستیک با کمپلکس پروتئین و مس واکنش می دهد. این واکنش به علت وجود اسیدهای آمینه تیروزین و تربیتوفان در ساختمان پروتئین می باشد (۱۰).

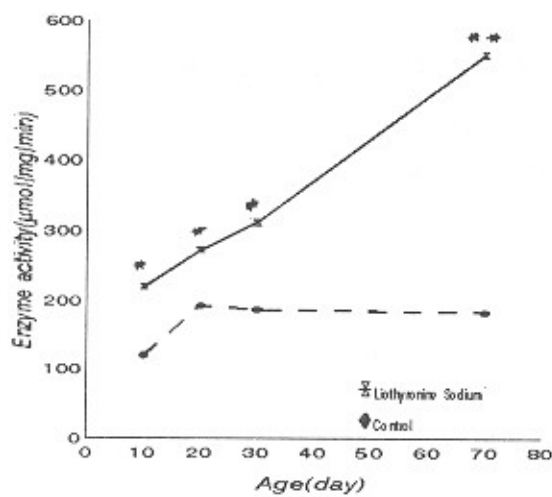
حلقه فنلی این اسیدهای آمینه با معرف سیوکالتو ایجاد رنگ آبی می کند.

از آنجاکه تیروزین در ساختمان تمام پروتئین ها وجود دارد و میزان آن با مقدار پروتئین بستگی دارد، با این روش می توان به میزان پروتئین نیز پی برد (۱۱).

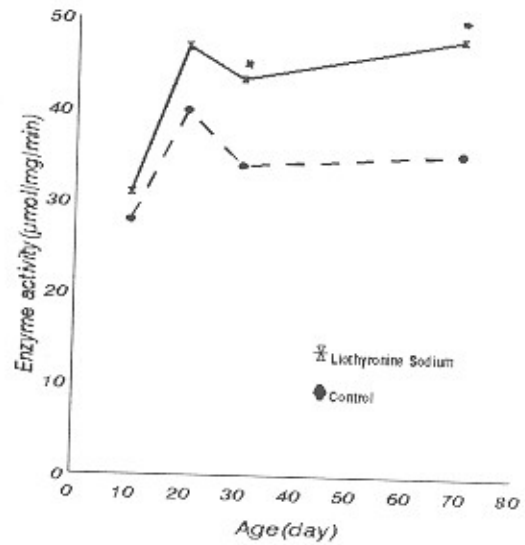
با استفاده از اسپکتروفتومتر و در طول موج ۷۵۰ نانومتر، می توان غلظت پروتئین نمونه را در مقایسه با استاندارد تعیین نمود.

$$\text{غلظت پروتئین نمونه} = \text{غلظت محلول استاندارد} \times \frac{\text{ابزورانس نمونه}}{\text{ابزورانس استاندارد پروتئین}}$$

$$\text{مقدار گلوکز} = \text{غلظت استاندارد گلوکز} \times \frac{\text{ابزورانس آزمایش}}{\text{ابزورانس استاندارد گلوکز}}$$



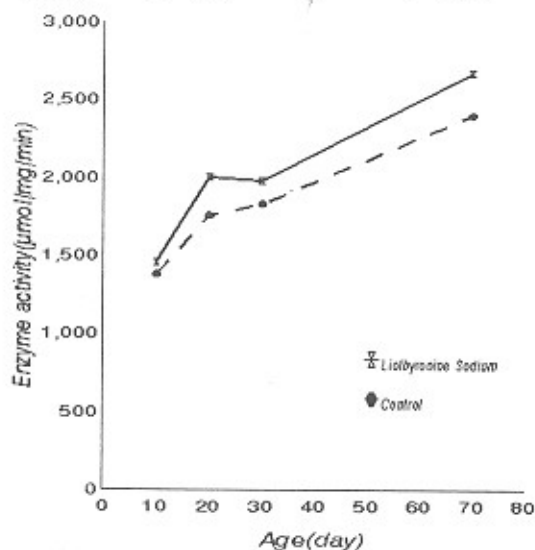
**نمودار شماره ۲:** نمایش تغییرات فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی  
 $P < 0.01$   $P < 0.05$



**نمودار شماره ۱:** نمایش تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی  
 $P < 0.05$

### نتایج:

تغییرات فعالیت آنزیم طی دوران رشد در هیپرتیروئیدیسم تجربی شبیه به حالت نرمال می‌باشد. در نمودار شماره ۲ تغییرات فعالیت آنزیم LDH در حالت پرکاری تجربی غده تیروئید در مقایسه با حالت کنترل، طی دوران رشد نشان داده شده است. در این نمودار دیده می‌شود که آنزیم LDH بیشترین افزایش فعالیت خود را در حالت نرمال تقریباً در ۲۰ روز اول

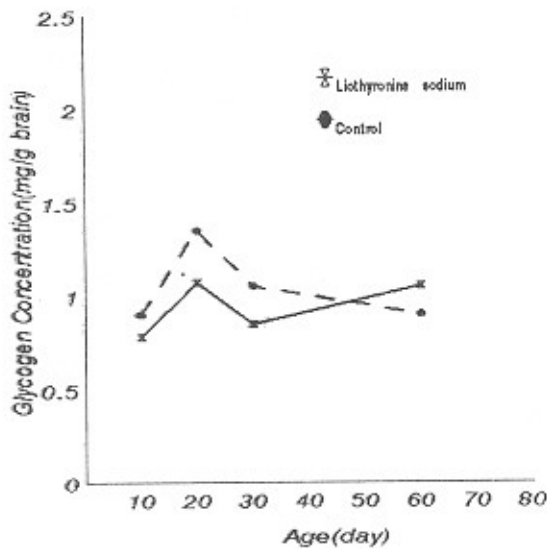


**نمودار شماره ۳:** نمایش تغییرات فعالیت آنزیم آکونیتاز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی

نتایج نشان داد که در حالت هیپرتیروئیدیسم تجربی فعالیت آنزیم هگزوکیناز مغز در مقایسه با کنترل در تمام طول رشد دارای افزایش می‌باشد، همچنین تزریق لیوتیروئین سدیم باعث افزایش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز بافت مغز نیز گردید، ولی تأثیری بر روی فعالیت آنزیم آکونیتاز نداشت. میزان گلوکز و گلیکوکوزن بافت مغز نشان دهنده عدم تغییرات معنی دار در حالت هیپرتیروئیدیسم تجربی در مقایسه با حالت کنترل بود.

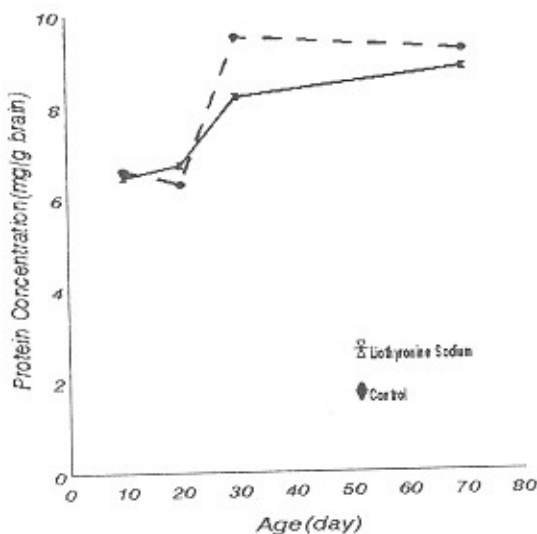
در نمودار شماره ۱ میزان تغییرات فعالیت آنزیم هگزوکیناز در مغز در طول رشد در حالت هیپرتیروئیدیسم در مقایسه با کنترل نشان داده شده است. در حالت هیپرتیروئیدیسم تجربی، افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با کنترل در تمام طول رشد مشاهده می‌گردد.

باتوجه به این نمودار مشاهده می‌شود که با افزایش سن، میزان فعالیت آنزیم در حالت پرکاری غده تیروئید نسبت به کنترل افزایش بیشتری می‌یابد و میزان این افزایش در روزهای ۳۰ و ۷۰ بعد از تولد قابل ملاحظه است ( $P < 0.05$ ). البته بایستی در نظر داشت که، الگوی



**نمودار شماره ۳:** نمایش تغییرات میزان گلیکوژن مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی

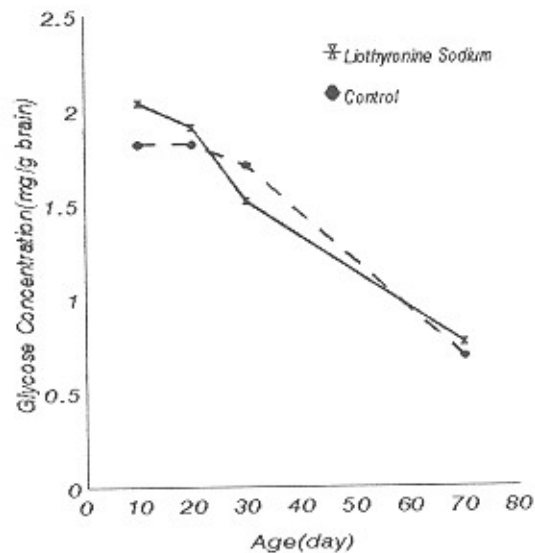
نسبی وجود دارد. در حالت پرکاری غده تیروئید میزان گلوکز در مقایسه به کنترل دارای تغییر معنی دار نمی باشد. نمودار شماره ۵ نمایانگر تغییرات میزان گلیکوژن در مغز در حالت پرکاری تیروئید و مقایسه با حالت کنترل می باشد و نشان دهنده عدم تغییراتی قابل توجه در میزان گلیکوژن مغز در این دو گروه است.



**نمودار شماره ۵:** نمایش تغییرات میزان پروتئین تام مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی

زندگی کسب نموده است و بعد از آن تغییر قابل توجهی در فعالیت این آنزیم بوجود نیامده است. در حالت پرکاری غده تیروئید، این آنزیم از ۱۰ روزه گی دارای فعالیت نسبتاً بالا نسبت به حالت کنترل می باشد (حدوداً دو برابر) و این افزایش فعالیت در سنین ۲۰ و ۳۰ روزه گی تقریباً به همان نسبت مشاهده می گردد، ولی افزایش فعالیت آنزیم در سن ۷۰ روزه گی در مقایسه با حالت کنترل بسیار زیاد می باشد. در این سن فعالیت آنزیم نسبت به کنترل حدود ۳ برابر افزایش می یابد.

نمودار شماره ۳ مربوط به تغییرات فعالیت آکونیتاز در طول رشد در Rat های مبتلا به هیپروتیروئیدیسم تجربی نسبت به Rat های نرمال می باشد. در هر دو گروه



**نمودار شماره ۴:** نمایش تغییرات میزان گلوکز در مغز Rat در طی دوره‌های زمانی مشخص و تحت رژیم دارویی

بیشترین افزایش در فعالیت آنزیم مربوط به ۲۰ روز ابتدای زندگی بوده و پس از این مدت، افزایش در فعالیت آنزیم به آرامی و با شیبی ملایم صورت گرفته است. در حالت پرکاری غده تیروئید، افزایش کمی در فعالیت آنزیم مشاهده می شود، که از نظر آماری معنی دار نیست. نمودار شماره ۴ نشان می دهد که در میزان گلوکز به ازاء افزایش سن در هر دو گروه مورد آزمایش، یک کاهش

بررسی میزان پروتئین Forbrain در Rat های مبتلا به پرکاری غده تیروئید و مقایسه با کنترل نشان دهنده کاهش جزئی در میزان پروتئین تام مغز Rat در روزهای بعد از ۳۰ روزه‌گی می‌باشد، که از نظر آماری معنی دار نیست و به طور کلی می‌توان عنوان نمود که میزان پروتئین در هر دو گروه تقریباً یکسان می‌باشد (نمودار شماره ۶).

### بحث:

آزمایشات انجام شده نشان می‌دهد که در هیپرتیروئیدیسم تجربی، بالا بودن میزان فعالیت آنزیم هگزوکیناز با عدم افزایش در میزان گلیکوزن در این دسته از Rat ها در مقایسه با کنترل همراه می‌باشد.

در پرکاری تجربی غده تیروئید، مشاهده می‌شود که فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز افزایش می‌یابد در حالی که آنزیم آکونیتاز افزایش فعالیت را نشان نمی‌دهد. با توجه به این امر می‌توان افزایش فعالیت مسیر گلیکولیز در این گروه از حیوانات را مورد توجه قرار داد. به نظر می‌رسد در حالت پرکاری غده به علت فعال شدن مسیر گلیکولیز، سنتز اسید پیرویک افزایش می‌یابد.

در حالت عادی چرخه تری کربوکسیلیک اسید، بیشتر اسید پیرویک حاصل از فرآیند گلیکولیز را برداشت نموده و با سوزاندن کامل آن تولید انرژی می‌کند و تنها مقدار ناچیزی اسید پیرویک، از مغز خارج می‌شود (۴).

در حالت پرکاری غده تیروئید، در اکثر بافت های بدن با افزایش غلظت اسید پیرویک، فعالیت این چرخه نیز افزایش می‌یابد و تحقیقات متعددی بیانگر افزایش مصرف اکسیژن در این بافت ها تحت تأثیر هورمون های غده تیروئید می‌باشد (۳).

اما یکی از استثنائاتی که در این زمینه وجود دارد، بافت مغز است که تحقیقات نشان دهنده عدم تغییر میزان اکسیژن مصرفی در این بافت تحت تأثیر هورمون های غده تیروئید می‌باشد (۳).

افزایش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز و عدم تغییر

در میزان فعالیت آنزیم آکونیتاز در این بررسی می‌تواند در مسیر همین دانسته ها قرار گیرد. مسئله عمده ای که به طور کلی در این راستا به آن برخورد می‌شود، تأثیر هورمون های غده تیروئید بر فعالیت آنزیم های هگزوکیناز و لاکتات دهیدروژناز و عدم تأثیر مشخص بر روی فعالیت آنزیم آکونیتاز می‌باشد. در توجیه این مسئله می‌توان تأثیر بر روی آنزیم های هگزوکیناز و لاکتات دهیدروژناز را همگام با نحوه اثر این هورمون بر روی فعالیت این دو آنزیم در سایر بافت های بدن، در جهت سنتز این آنزیم ها از طریق تأثیر بر روی DNA در هسته سلولی و ایجاد mRNA دانست (۱۲).

به این ترتیب بایستی هورمون های غده تیروئید قابلیت نفوذ به داخل سلول های مغز را داشته و ریسپتورهای لازم جهت تأثیر این هورمون ها در سطح DNA وجود داشته باشد.

اما نکته دیگر عدم تأثیر این هورمون ها بر روی مصرف اکسیژن در سلول های مغزی بر خلاف بیشتر بافت های بدن می‌باشد (۳). در توجیه این مسئله بایستی عنوان نمود که بر روی غشاء میتوکندری بافت های حساس به هورمون تیروئید مانند کبد، کلیه، هیپوفیز، قلب، ریه و روده، ریسپتورهایی با قابلیت اتصال به این هورمون ها وجود دارد (۱۳، ۱۴). ولی هنوز به خوبی مشخص نیست که اتصال هورمون به این ریسپتورها به چه منظور صورت می‌پذیرد.

مشاهدات حاکی از این امر است که تیروکسین هم به صورت *In vivo* و هم به صورت *In vitro* بر روی میتوکندری اثر گذاشته و باعث تورم میتوکندری در بافت های حساس می‌شود (۱).

همچنین به صورت *In vitro* باعث افزایش در تعداد و اندازه میتوکندری نیز می‌گردد (۱). اما در بافت های غیر حساس مانند مغز، این گونه اثرات مشاهده نمی‌شود (۱۵، ۱).

مطالعات نشان می‌دهد که تعداد این ریسپتورها در

بافت مغز بسیار کم بوده (۱۳) و احتمالاً عدم تأثیر هورمونهای غده تیروئید بر روی فعالیت آنزیم آکونیتاز در سلولهای مغز، می تواند ناشی از کمبود این گونه گیرنده ها در روی غشاء میتوکندری باشد. به عبارت دیگر می توان گفت که احتمالاً تأثیر هورمون های غده تیروئید در سطح میتوکندری در بافت های حساس به دنبال اتصال این هورمون ها با رستورهای موجود بر روی غشاء میتوکندری صورت می پذیرد.

## References:

- 1- Oppenheimer JH. Thyroid function and Disease: From EB Saunders Company. philadelphia. Firsth Edition, 93-95, 1989.
- 2- Hall R. Fundamental of clinical Endocrinology: From Longman Singapore Publichers, 4th ed, 73: 1989.
- 3- Greenspan F. Basic and clinical Endocrinology: From Prentice Hall International Inc, (205): 1991.
- 4- Vanpilsun JF. Metabolism of individual tissues. In: Devlin TM. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations: From John Wiley & Sons, Inc. 1045-1046: 1982.
- 5- Darrow RA.; Colowick SP. Hexokinase from Bakar's Yest. In: Colowick SP, Kaplan NO. Methods in enzymology(I): From Academic press: London. 226-228: 1962.
- 6- Neilands JB. Lactic Dehydrogenase of Heart Muscle. In: Colowick SP, Kaplan NO. Methods in enzymology (I): From Academic press Inc, Publishers, Newyork, (226-228): 1955.
- 7- Anfinsen CB. Aconitase from Pig Heart Muscle. In: Colowick SP, Kaplan NO. Methods in enzymology(I): From Academic press Inc, Publishers, Newyork, (695-699): 1965.
- 8- Caraway WT.; Watts NB. Carbohydrats. In: Tiets NW. Fundamental of Clinical chemistry: From WB Saunders Company. 3th ed, 430: 1987.
- 9- Rafelson ME.; Binkley SB.; Hayashi J. Basic Biochemistry: From The Macmillan Company. Newyork, 3th ed. 105-107: 1971.
- 10- Kjeldsberg CR.; Krieg AF. Cerebrospinal Fluid and other Body Fluids. In: Tood: Sonfourd: Davidson: Clinical Diagnosis and Managment: From WB Saunders Company. 7th ed, 468: 1984.
- 11- Lowry WH.; Rosebrough NY.; Farr AL.; Rohdal R. Protein Measurment. J Biol chem, 193-205, 1951.
- 12- Larry J; Leslie Degroo. Mechanism of Thyroid Hormone Action. In: Leslie Degroot. Endocrinology: From WB Saunders 3th ed, 585: 1995.
- 13- Katzung BG. Examination and Board Review Pharmacology: From Appleton and Lange. 3nd ed, 209-210: 1993
- 14- Mayes PA. The Citric Acid Cylce - the catabolism of Acetyl-Co A. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harpers Biochemistry: From Long Medical Publication. 23th ed, 166: 1993.
- 15- Robbins SJ.; Rall JE.; Gorden P. The thyroid and Iodin metabolism. In: Bound Ph. K, Rosenberg LE. Disease of Metabolisme: From WB Saunders Company Philadelphia. 1009-1030: 1974.
- ۱۶- صمعی فومنی م. اثر هورمونهای تیروئید روی فراکسیونهای مختلف چربی سرم و کبد. پایان نامه دکترای داروسازی. دانشگاه اصفهان، ۸۱، ۱۳۶۵